

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-59840

(43) 公開日 平成7年(1995)3月7日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00	C			
A 6 1 K 9/70	3 4 1			
	3 5 8			
35/16	ADA	7431-4C		

A 6 1 L 15/ 03

審査請求 未請求 請求項の数 1. O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-207605

(22) 出願日 平成5年(1993)8月23日

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 松井 理佐子

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72) 発明者 小出 幹夫

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 創傷治癒材

(57) 【要約】

【構成】 血清、血漿あるいは血小板抽出液をヘパリンカラムを用いて、生理的条件下でヘパリンカラムに結合し、0.5M NaCl溶液および／または1.0M NaCl溶液に溶出する画分、およびコラーゲン及びヘパリンを含む基材からなる創傷治癒材。

【効果】 生体適合性および創傷治癒に優れている。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血清、血漿あるいは血小板抽出液をヘパリンカラムを用いて、生理的条件下でヘパリンカラムに結合させ、0.5M NaCl 溶液および／または 1.0M NaCl 溶液により溶出される画分と、コラーゲン及びヘパリンを含む基材からなる創傷治癒材。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、組織の修復や創傷の治療に用いる創傷治癒材に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 熱傷、採皮創および皮膚剥削創、外傷性皮膚欠損創等の疾患ないし創傷による患部を保護し、治療を促進する目的のために、患部に一時的に適用される創傷被覆材として、従来、ガーゼ、脱脂綿等が用いられてきたが、これらは細菌感染防止が低く、かつ滲出液を速やかに吸収するために創面が乾燥してしまうと取り外す際に、痛み、出血等を伴った。また、軟膏等を併用することも行われているが、この場合は逆に滲出液の吸収が不十分で創面が過度に湿った状態になってしまうものであった。

【0003】 また、これらに代わるものとしては、特に創面が広範囲にわたる場合に適用されるものとして、シリコン製ガーゼ、シリコンゴム製およびペロアー状の表面構造を有するナイロン、テフロンなど合成樹脂シート等の人工材料の被覆膜や凍結乾燥豚皮、フィブリン膜、キチン不織布、コラーゲン膜、ポリアミノ酸スポンジ、ムコ多糖複合コラーゲン膜等の生体由来材料の被覆膜も知られている。しかしながら、これらのうち人工材料の被覆膜は、患部との密着性、水蒸気透過性、ひび割れなどの点で種々の問題点を残し、一方生体由来材料の被覆膜は生体適合性が良いなどの特徴を有するが、その多くは抗原性を有し、また細菌感染、滲出液による劣化などの欠点を有し、さらに材料が入手しにくい等の問題があった。

【0004】 さらに最近では、コラーゲン処理したナイロンメッシュとシリコン膜からなる複合膜が開発され実用化されており、よく密着し、適度な水分透過性を有するが、創面に固着し、肉芽組織が被覆膜中に入り込むという欠点があった。一方、創傷治癒を目的とした薬が開発され、例えば塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic FGF [basic fibroblast growth factor])、血小板由来増殖因子 (PDGF [platelet-derived growth factor])、CHL-Cu 錯体 (Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu Complex) やヘパリン-銅錯体などがある。これらはいずれも血管新生因子として知られている。しかしこれらの血管新生因子は創傷面に適用した場合、創面から流れ出してしまうため半減してしまう。このため、適用頻度を多くする必要があったり、他のマトリックス (例えば合成樹脂) の中に含有して使用したりする。また、

これらの血管新生因子は非常に高価であるため、特開昭 63-79588号のように  $\beta$ -TGF や PDGF を複数類含んだ血小板由来の細胞増殖因子を使用している。

【0005】 また、これら血管新生因子を使用しないである程度の効果が得られているが、十分な効果が得られているとは言えない。例えば、コラーゲン・ヘパリン複合体は生体適合材料として人工血管や人工臓器に用いる場合に、生体適応性に優れ、また内皮細胞の増殖性に優れていることが特開昭 63-68174号に記載されている。特開昭 60-222425 には、コラーゲンおよび走化性を誘発されるグルコサミノグリカンの懸濁液からなる創傷治癒剤が記載されている。また、特開昭 63-54328 には線維状コラーゲンとヘパリンまたはヘパリン類似のグリコサミングリカンと血小板由来増殖因子あるいは線維芽細胞成長因子の混合物からなる創傷包帯がある。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従来の創傷治癒剤あるいは人工皮膚は、上述したようにそれぞれ問題点を有しているので、熱傷等により皮膚組織が損失した場合の患部に対する処理としては、自家移植 (autograft) が現在最善の方法とされている。しかしながら、皮膚欠損部が広範囲にわたる場合等においては、非常に困難であり、適用可能であっても長時間にわたって幾度となく繰り返す必要がある。

【0007】 また、自家移植に代わって患部を一時的に被覆する方法として他家 (アログラフト) が適用されている。他家移植は血管が確保されているため、感染しにくいなどの利点があるが、やがては表皮部分は脱落してしまう。そこで、自家移植や他家移植に代わって患部を被覆して毛細血管等を早期に誘導して細菌感染を防止することができる創傷治癒剤や人工皮膚の開発が望まれている。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 上記目的は、下記の構成を有する本発明の創傷治癒材によって達成される。

(1) 血清、血漿あるいは血小板抽出液をヘパリンカラムを用いて、生理的条件下でヘパリンカラムに結合させ、0.5M NaCl 溶液および／または 1.0M NaCl 溶液により溶出される画分と、コラーゲン及びヘパリンを含む基材からなる創傷治癒材。

(2) 前記溶出される画分が 1.0M NaCl 溶液の条件下で溶出され、更に 0.5M NaCl 溶液の画分を除く上記 (1) 記載の創傷治癒材。

(3) 前記コラーゲンは、牛真皮由来のコラーゲンを原料とし、ブロクターゼ又はペプシンにより分子末端の抗原基のテロペプチドを除去したアテロコラーゲンである上記 (1) ~ (2) 記載の創傷治癒材。

【0009】 (4) 前記コラーゲンは、牛真皮由来のコラーゲンを原料とし、それを中性緩衝液を添加して再

構成した線維化アテロコラーゲンである上記(1)～(3)記載の創傷治癒材。

(5) 前記コラーゲンを含む基材にヘパリンを含有させ、線維化アテロコラーゲンとヘパリンが可逆的な架橋で結合されている上記(1)～(4)記載の創傷治癒材。

また、本発明は下記の構成により達成される。

(6) 水蒸気透過調節層と創傷治癒層からなる人工皮膚であって、当該創傷治癒層は、血清、血漿あるいは血小板抽出液を、ヘパリンカラムを用いて生理的条件下でヘパリンに結合させ、更に1.0M NaCl溶液で溶出される画分を含有する、線維化アテロコラーゲン及び変性アテロコラーゲンを含む基材からなることを特徴とする人工皮膚。

【0010】(7) 水蒸気透過調節層と創傷治癒層からなる人工皮膚であって、当該創傷治癒層は、血清、血漿あるいは血小板抽出液において、ヘパリンカラムを用いて生理的条件下でヘパリンに結合させ、更に1.0M NaCl溶液の条件下で溶出されて得られる画分を含有する、線維化アテロコラーゲンおよび/または変性アテロコラーゲンとヘパリンおよび/またはヘパリン類似物のグリコサミノグリカンの基材からなる上記(6)記載の人工皮膚。

(8) 前記コラーゲンは、牛真皮由来のコラーゲンを原料とし、抗原基を除去し、それを40～90℃の温度範囲で熱変性させたアテロコラーゲンである上記(6)～(7)記載の人工皮膚。

(9) 水蒸気透過調節層はシリコンエラストマーである上記(6)～(8)記載の人工皮膚。

【0011】本発明の創傷治癒材は、血清、血漿あるいは血小板、特に血小板凝集を生起させ、この際放出される種々の細胞増殖因子等を含んだ抽出液を生理的条件下でヘパリンカラムを通してヘパリンカラムと結合させ、0.5M NaCl溶液及び1.0M NaCl溶液の条件下で溶出される画分を含むコラーゲン基材からなる。本発明における、血清、血漿あるいは血小板抽出液を生理的条件下でヘパリンカラムを通してヘパリンとヘパリン結合させ、0.5M NaCl溶液及び1.0M NaCl溶液の条件下で溶出される画分について、具体的に説明する。本発明において、具体的に生理的条件とは、pH6～8範囲の生理食塩水および生理食塩水とpH緩衝液等を使用することをいう。

【0012】ヒトあるいはラット等の血清あるいは血小板抽出物をヘパリンカラムに添加し、りん酸緩衝液-生理食塩水(PBS溶液)で充分に洗浄し、0.5M NaCl溶液で溶出される画分をフракシオン(Fraction) Iとし、1.0M NaCl溶液で溶出される画分をFraction IIとする。更に、1.6M NaCl溶液で溶出される画分をFraction IIIとする。

【0013】これらのフракシオンは、電気泳動による

分析するとFraction Iの成分としては、主にPDGF(MW 30,000)、プロスロムビン(prothrombin, MW 72,000)、フィブロネクチン(fibronectin, MW 250,000)、ビトロネクチン(vitronectin, MW 75,000)等が含まれていた。

【0014】Fraction IIの成分はβ-スロンボグロブリン(thromboglobulin: β-TG, MW 8,900)、ロウ-アフィニティプレイトレットファクター(low-affinity platelet factor 4: LA-PF4, MW 9,200)、プレイトレットベーシックプロテイン(platelet basic protein: PBP, MW 10,000)、ヘパトサイトグロウスファクター(hepatocyte growth factor: HGF, MW 85,000)等が含まれる。

【0015】Fraction IIIの成分は、プレイトレットファクター(platelet factor 4: PF4, MW 12,000)、アンチスロンビンIII(anti thrombin III: AT III, MW 65,000)が含まれていた。

【0016】本発明で利用できるコラーゲンとしては、特に限定しないが、牛真皮を酸性溶液中でプロテアーゼ処理して得られるタイプIコラーゲンが好適である。このコラーゲンは一般的には低イオン強度下0.3%以下の濃度の酸性溶液では透明で均一な溶液状態であるが中性条件下ではイオン強度、温度等を適宜選択することにより生体中での状態と類似した線維を形成させることができる。タイプIコラーゲンは無架橋の単分子状態では分子量300,000の3本鎖ヘリックス構造を有する長さ3000Å(Å=1×10<sup>-8</sup>m)、直径15Åの棒状分子でその両端部にテロペプチドと呼ばれるアミノ酸10数残基からなる非ヘリックス構造を有する。このテロペプチド部位は未変性コラーゲンの抗原性の殆どを占め、ペプシン等のプロテアーゼによる加水分解で容易に除去することができる。

【0017】また、本発明においてコラーゲンを含む基材には、ヘパリン等を含有させても良い。本発明は更に、前記人工皮膚の変性コラーゲンのヘリックス含量が0～80%である人工皮膚によって達成される。本発明は更に、前記人工皮膚の変性コラーゲンの含有比が全体の5～30重量%である人工皮膚によっても達成される。本発明の人工皮膚のペプシンの含有比は、好ましくは0.1～2.0重量%、より好ましくは0.5～1.0重量%である。更に本発明に用いる変性コラーゲンは分子的にコラーゲン特有の3重鎖ヘリックス含量が0～80%、好ましくは0～50%、より好ましくは30～50%のもので、コラーゲンの変性には、例えば加熱処理、化学処理又は物理処理等により行うことができ、特にコラーゲン溶液を加熱処理することが最も好ましい。

【0018】本発明を創傷治癒材として用いる場合、創傷治癒材は上記アテロコラーゲンをpH3溶液(塩酸等)

に溶解させ、0.3 (w/v) %とし、次いでこの溶液をりん酸緩衝液-生理食塩水 (PBS 溶液) を加え、37℃の恒温槽で4時間処理すると、アテロコラーゲンは線維化して白濁化する。この懸濁液を遠心分離して所定の濃度に濃縮して、凍結乾燥した。この基材を真空中110℃で2~8時間加熱処理を行った。一方前述した方法で分離した Fraction I あるいは Fraction II を含浸させる。より好ましくは Fraction II が好ましい。本発明の創傷治癒材の作成方法は、何ら限定されるものではなく、血清、血漿あるいは血小板抽出液をヘパリンカラムを用いて、生理的条件下でヘパリンに結合させ、0.5 M NaCl 溶液および/または1.0 M NaCl 溶液により溶出される画分と、コラーゲンを含む基材を混ぜ合わせれば良い。

【0019】以下、実施例を示し本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【実施例】

##### (実施例1) ラット血清調製

ラット血液25mlをオートセップ (テルモ (株) 製) に採取し、室温2時間放置し、更に4℃で一晩放置した。この溶液を3000rpmで15分間遠心分離し、0.45μmフィルターで濾過して、10mlの血清を得た。

##### 【0020】(実施例2) ラット血小板抽出物の調製

ラット血液75mlを0.1容の0.15M NaCl-7.7mM EDTA (pH7.4) 溶液で採取し、1000rpmで15分間遠心分離を行ない、多血小板血漿を採取した。更に3000rpmで15分間遠心分離し、沈査 (血小板) を0.01M PB (pH7.0)-0.15M NaCl 溶液で2回洗浄を行なった。この溶液を1mM PMSF (フェニルメチル スルフォニル フルオライド)-7.7mM EDTA-0.01M PB (pH7.0)-0.15M NaCl 溶液 1mlに懸濁し、15分間超音波処理を行ない、3000rpmで15分間遠心分離を行なった。得られた溶液を孔径0.45μmフィルターで濾過して、 $0.8 \times 10^{10}$  の血小板抽出物を得た。

##### 【0021】(実施例3) ヘパリン結合物質の分離

実施例1と2で分離した血清及び血小板成分をウシコラーゲン-セファロース4Bおよびウシ変性コラーゲン-セファロース4Bに流した。この通り画分をヘパリン-セファロースCL-6Bカラムに流した。0.15M NaCl-0.01M PB (pH7.0) 溶液で十分に洗浄した後、0.5M NaCl 溶液で溶出した画分を Fraction I とした。次に1.0M NaCl 溶液で溶出した画分 Fraction II とした。更に1.6M NaCl 溶液で溶出した画分を Fraction III とした。

##### 【0022】(実施例4) ヘパリン結合物質を含浸させた人工皮膚の作製

アテロコラーゲン粉末 (高研 (株) 製) を4℃の温度下でpH3.0の希塩酸に溶解して0.3~0.4 (w/v) %に

調製した。この溶液にヘパリンナトリウム溶液 (ブタ小腸粘膜由来) を加え、4℃に維持しながらpH7.4のりん酸緩衝液を加え、最終濃度が0.2 (w/v) %アテロコラーゲン (30mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100mM NaCl) であるコラーゲン・ヘパリン溶液とした (ヘパリン0.5mg/コラーゲン100mg)。

【0023】次いで37℃の恒温槽内に4時間放置し、線維化アテロコラーゲン・ヘパリン (FC・Hp) 溶液を調製した。このFC・Hp溶液を無菌条件下で遠心操作による濃縮を行ない、濃度を2 (w/v) %に調製した。一方、無菌のアテロコラーゲン粉末に無菌の蒸留水に6.6 (w/v) %となるよう再溶解し、これを60℃の恒温槽内に30分間放置して熱変性を生ぜしめ変性アテロコラーゲン溶液とした。この溶液をステンレスパットに注入し、-30℃以下で急速に冷却して十分凍結させた後、-40℃/0.1トール未満の真空中で凍結乾燥した。このコラーゲンスポンジのマトリックスに Fraction I ( $84.3 \mu\text{g}/0.15\text{M NaCl}$  溶液10ml) を含浸させた。

##### 【0024】(実施例5) ヘパリン結合物質を含浸させた人工皮膚の作製

実施例4と同様な方法でコラーゲンスポンジを作製した。このマトリックスに Fraction II ( $2.4 \mu\text{g}/0.15\text{M NaCl}$  10ml) を含浸させた。

##### 【0025】(比較例) ヘパリン結合物質を含浸させた人工皮膚の作製

実施例4と同様な方法でコラーゲンスポンジを作製した。このマトリックスに Fraction III ( $1.9 \mu\text{g}/0.15\text{M NaCl}$  10ml) を含浸させた。

##### 【0026】(試験例1) ラット皮下埋入試験

実施例4~6で作製したマトリックスをラット皮下に埋入し、病理学的に組織像を検索する。皮下埋植 (埋入) には、約200gのSDラット雌性ラットを用いる。埋入前に、5倍希釈ネブタールで麻酔後ラットの背面を手術用のイソジン液 (明治製菓 (株) 製) でぬらし、毛刈り用カミソリで毛の刈り残しがないように、背面をイソジンとエタノールで消毒する。各々の切り込みから、ラットの皮筋下の疎性結合組織内に空隙を作るように切り込みを広げる。この空隙に検体をさし込み、検体全体が平らに横たわるようにする。角針付ナイロン糸で切り口を縫合する。切り口は3針縫う。同じ検体を別のラットにも同様に埋入する。埋入後、1, 3, 7, 14日目に動物をエーテルあるいは2倍希釈ネブタールを用いて殺す。埋入検体が組織中に留まっているようにして、ラットの背筋上の皮膚組織を8cm×12cmあるいはそれ以上の大きさに切り取る。この組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液中に置き、一昼夜放置し固定後、病理組織検索を施す。

【0027】病理組織検索は組織からの検体の切り出しに始まる。検体が確実に含まれるように、組織を0.5c

$m \times 2.5 \text{ cm}$ 程度の短冊状に切り出す。これをエタノール、次にキシレンで透徹し、最後にパラフィンに置換する。置換後、固型パラフィンの加熱溶解液に、検体を含む組織を置き、急冷してパラフィン包埋を完了する。包埋された組織は、ヤマト（株）製回転式マイクロームにて薄切を行ない、厚さ  $4 \mu m$  のパラフィン切片とする。これを脱パラフィンした後、任意の染色法で病理組織染色を行ない、プレパラートを完成する。病理組織染色として、ヘマトキシリン-エオジン（H・E）染色を採用した。病理組織の所見から、Fraction I と Fraction II を含浸した人工皮膚を使用した場合、線維芽細胞及び血管の侵入が良好であった。しかし Fraction III を含浸した人工皮膚では線維芽細胞等の侵入性は悪く、むしろ阻害していた。

【0028】

【発明の効果】以上述べたように本発明は、コラーゲンあるいはコラーゲンとヘパリンを含む基材に、血清、血漿あるいは血小板から抽出される物質の中でヘパリンと結合するものを担持させてなることを特徴とする創傷治療材であるから、生体内に適用された際、細胞増殖を強く支持するものであって、かつ生体適合性が高いために、例えば人工皮膚として適用された場合に早期の肉芽層形成ないし表皮形成をもたらす治癒促進を図ることのできるものとなる。さらに本発明の創傷治療材は、通気性を有する支持層、例えばシリコンからなる支持層で裏打ちされることもでき、これによって例えば人工皮膚として適用された場合、体液漏出、細菌感染等の発生を最小限におさえることが可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 61 L 15/44